

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

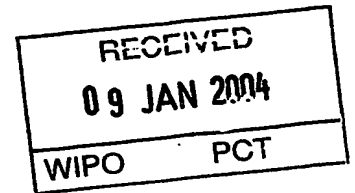
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 1 月 2 2 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 3 8 8 6 4  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 2 - 3 3 8 8 6 4 ]

出 願 人                      明 治 製 菓 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):                      ク ニ ミ ネ 工 業 株 式 有 限 公 司

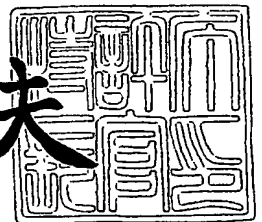


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月    1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 P141316K

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/98  
A23K 1/16

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区師岡町 7 6 0 番地 明治製菓株式  
会社 薬品総合研究所内

【氏名】 小山 利一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区師岡町 7 6 0 番地 明治製菓株式  
会社 薬品総合研究所内

【氏名】 木村 文男

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市中央台鹿島 3 丁目 1 7 の 4

【氏名】 菊池 弘

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町滝尻字御前田 3 8 番地の 1 7 大平  
コーポ 1 0 3 号

【氏名】 黒崎 和夫

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000104814

【氏名又は名称】 クニミネ工業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100074077

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 藤郎

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086221

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 裕也

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009014

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9910711

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 粒状酵素組成物およびその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核および核を被覆する層からなる酵素組成物であって、核が糖類で、核を被覆する層が酵素および硬化油であることを特徴とする粒状酵素組成物。

【請求項 2】 糖類が、グラニュー糖または乳糖である請求項 1 記載の粒状酵素組成物。

【請求項 3】 硬化油が、パーム硬化油である請求項 1～2 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物。

【請求項 4】 酵素が、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼのうちもしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物。

【請求項 5】 酵素が、セルラーゼの一もしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物。

【請求項 6】 酵素が、トリコデルマ・ビリデ由来のセルラーゼである請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物。

【請求項 7】 酵素含有量が、0.1～15 重量%である請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物。

【請求項 8】 溶融した硬化油と酵素の混合物を、粒状の糖類に付着あるいは皮膜を形成させることを特徴とする請求項 1 記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 9】 糖類が、グラニュー糖または乳糖である請求項 8 記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 10】 硬化油が、パーム硬化油である請求項 8～9 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 11】 酵素が、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼのうちもしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 8～10 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 12】 酵素が、セルラーゼの一もしくは二以上を組み合わせてな

るものである請求項 8～11 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 13】 酵素が、トリコデルマ・ビリデ由来のセルラーゼである請求項 8～12 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 14】 粒状酵素組成物中の酵素含有量が、0.1～15 重量%である請求項 8～13 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法。

【請求項 15】 ペレット状飼料の製造にあたり、請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物を使用する方法。

【請求項 16】 請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物を配合してなるペレット状飼料。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、粒状酵素組成物およびその製造法に関する。さらに詳細には、酵素の湿熱安定性を高めた粒状酵素組成物および溶融した硬化油と酵素の混合物を、粒状の糖類に付着あるいは皮膜を形成させることにより、当該粒状酵素組成物を製造する方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

酵素は通常の乾燥状態では粉末状であり、この状態で洗剤、加工食品、医薬品などに用いられているが、流動性が劣ること、発塵による吸入、皮膚接触などでアレルギー症状などを起こすことがあり、実用上好ましくない。したがって、必要に応じて一定の形状に加工して使用に供することが行われている。

##### 【0003】

また、酵素を家畜飼料に添加して用いる場合、高温高湿の条件下では、一般的に酵素活性が低下する。また、飼料工場では飼料やその原料中に通常存在するサルモネラなどの有害細菌等を殺菌するため、飼料のペレット化に際し、約 80℃の蒸気により飼料を湿熱処理することが行われている。一方、夏場の屋外の飼料保管タンク内では温度 50℃、湿度 80%を超えることもある。

##### 【0004】

以上のようなことから、酵素粉末が飛散し難く、高温高湿においても酵素活性が著しく低下しないような安定な酵素製剤が求められている。従来から、粒状酵素組成物は、その取り扱いが容易であることから比較的良く用いられている形状であり、これは押出造粒、マルメ造粒などの方法で製造されている。

例えば、酵素とメッシュ粒度が20～100（粒度：840～150 $\mu$ m）の粉粒状低融点物質との混合物を流動下、低融点物質の融点以上に加熱し、造粒することを特徴とする細粒または顆粒状酵素の製造法（特許文献1参照）が報告されている。

#### 【0005】

また、酵素の飛散を抑制する方法としては顆粒製剤とする方法があり、それらには、セルロースを核として顆粒を製造する方法（特許文献2参照）、低融点物質を核として顆粒を製造する方法（特許文献3参照）、核にバインダー物質と酵素を溶解した液を吹き付ける方法（特許文献4および5参照）、塩類および／または糖類を核として、これに溶解した低融点物質および酵素を被覆した後に高融点物質を添加する方法（特許文献6参照）などがある。しかし、これらの方法は、製造工程が複雑であり、しかも高温高湿条件での酵素の安定性が低いという欠点を有している。

#### 【0006】

また、高温高湿下において酵素の安定性を維持する方法として、酵素を含有する核を疎水性物質と水不溶性物質によりコートする方法（特許文献7参照）がある。しかしながら、この方法は、複雑な製造工程が必要であり、製造時間も多にかかる上に、造粒機も限定されたものとなっている。

#### 【0007】

##### 【特許文献1】

特公平4-13019号公報

##### 【特許文献2】

特開平1-112983号公報

##### 【特許文献3】

特開昭58-214333号公報

## 【特許文献 4】

特開昭60-37983号公報

## 【特許文献 5】

特開昭60-37984号公報

## 【特許文献 6】

特公平3-64108号公報

## 【特許文献 7】

特表平11-514240号公報

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、高温高湿条件において安定な粒状酵素組成物および当該粒状酵素組成物の簡便で、効率的な製造法を提供することを目的としている。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

粒状酵素組成物の有効成分である酵素は、一般的に噴霧乾燥法で粉体としたものが用いられているが、本発明者は、油脂が一定温度で熔融、固化する性質を利用し、このような酵素原末の粉体を油脂に懸濁して、適当な担体に付着あるいは皮膜を形成させることで、湿熱の負荷が直接に酵素粉体に影響を及ぼさない構造物を得られることを見出した。さらに、工程が少なく簡便に当該酵素組成物を製造する方法を開発して、本発明を完成した。

## 【0010】

請求項1記載の本発明は、核および核を被覆する層からなる酵素組成物であって、核が糖類で、核を被覆する層が酵素および硬化油であることを特徴とする粒状酵素組成物である。

請求項2記載の本発明は、糖類が、グラニュー糖または乳糖である請求項1記載の粒状酵素組成物である。

請求項3記載の本発明は、硬化油が、パーム硬化油である請求項1～2のいずれか1項記載の粒状酵素組成物である。

請求項4記載の本発明は、酵素が、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、

リパーゼのうち一もしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物である。

請求項 5 記載の本発明は、酵素が、セルラーゼの一もしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物である。

請求項 6 記載の本発明は、酵素が、トリコデルマ・ビリデ由来のセルラーゼである請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物である。

請求項 7 記載の本発明は、酵素含有量が、0.1～15 重量%である請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物である。

#### 【0011】

請求項 8 記載の本発明は、溶融した硬化油と酵素の混合物を、粒状の糖類に付着あるいは皮膜を形成させることを特徴とする請求項 1 記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 9 記載の本発明は、糖類が、グラニュー糖または乳糖である請求項 8 記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 10 記載の本発明は、硬化油が、パーム硬化油である請求項 8～9 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 11 記載の本発明は、酵素が、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼのうち一もしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 8～10 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 12 記載の本発明は、酵素が、セルラーゼの一もしくは二以上を組み合わせてなるものである請求項 8～11 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 13 記載の本発明は、酵素が、トリコデルマ・ビリデ由来のセルラーゼである請求項 8～12 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法である。

請求項 14 記載の本発明は、粒状酵素組成物中の酵素含有量が、0.1～15 重量%である請求項 8～13 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物の製造法である。

#### 【0012】

請求項 15 記載の本発明は、ペレット状飼料の製造にあたり、請求項 1～7 の

いずれか 1 項記載の粒状酵素組成物を使用する方法である。

請求項 16 記載の本発明は、請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の粒状酵素組成物を配合してなるペレット状飼料である。

### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

請求項 1 記載の本発明は、核および核を被覆する層からなる酵素組成物であって、核が糖類で、核を被覆する層が酵素および硬化油であることを特徴とする粒状酵素組成物である。

本発明に係る粒状酵素組成物は、有効成分である酵素を硬化油に懸濁し、適当な担体に付着あるいは皮膜を形成させて固化させることで、湿熱による影響を酵素が直接受けない構造になっている。

そのため、この粒状酵素組成物は、湿熱安定性を有する。本明細書において、「湿熱安定性」とは、酵素組成物が加湿および／または加熱されるような条件に曝される場合において、それらの条件による酵素タンパク質の変性の度合いを低減し、組成物に含有される酵素の活性を維持できる性質を意味し、より具体的には、約 80℃ のスチーム加熱条件下で 1 分間曝された場合に、75% 以上の酵素の活性を維持することを指す。この加熱条件は、通常行われる飼料のスチーム滅菌の工程や、夏季において野外に設置された飼料保管タンク内の環境条件などと比べて苛酷な条件である。

### 【0014】

本発明が適用される酵素としては、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ等があり、これらは単独で、あるいは二種以上を組み合わせて用いることができる。特に、セルラーゼが好ましい。

本発明において使用する酵素は、通常粉末状であり、酵素生産菌を通常の方法で培養して得られた培養液から調製しても良く、また市販の酵素原末でも良い。例えば、セルラーゼの場合、培養液からの調製方法は、アスペルギルス・ニガー、フミコラ・インソレンス、トリコデルマ・ビリデ、アクレモニウム・セルロリティカス、フザリウム・オキシスポーラム、リゾプス・オリゼなどの当該酵素

生産能を有する微生物を培養したのち、培養物を遠心分離などの操作を行うことにより上清液を得て、その後、必要に応じてこれを限外濾過法などにより濃縮し、噴霧乾燥法などで目的とするセルラーゼ原末を得ることができる。

#### 【0015】

次に、本発明に用いる硬化油としては、動物硬化油、例えば牛脂硬化油、豚脂硬化油、あるいは植物硬化油、例えばナタネ硬化油、大豆硬化油、オリーブ硬化油、パーム硬化油、ヒマシ硬化油などが挙げられる。これらの中では植物硬化油が好ましく、とりわけパーム硬化油が好適である。なお、乾性油、半乾性油、不乾性油などは粘度が高いため、取り扱いが困難であり、また核の中にしみ込むことがあるので、好ましくない。これに対して、硬化油は約50℃以上の温度で溶融するので酵素を懸濁することができ、温度を下げると、容易に固体となり、核を被覆することができる。また、核にしみ込むこともない。

本発明に用いる硬化油としては、約50℃以上、好ましくは約50～65℃の融点を有するものが適当である。

また、糖類は、酵素組成物の核を構成するものであり、本発明には、例えばショ糖の粒状結晶であるグラニュー糖、乳糖、三温糖、ショ糖などが用いられ、これらの中では、グラニュー糖や乳糖がより好ましい。

#### 【0016】

粒状酵素組成物中における酵素の含有量については、通常0.1～15重量%であり、1～10重量%が好適である。酵素含有量が0.1重量%より少ないと、不均質となり、また酵素含有量が15重量%を超えると、パーム硬化油の増量に伴う固結が生じることがある。

#### 【0017】

次に、請求項8記載の本発明に係る粒状酵素組成物の製造法について説明する。

本発明の製造法は、溶融した硬化油と酵素の混合物を、粒状の糖類に付着あるいは皮膜を形成することからなる。

この粒状酵素組成物は、その組成並びに構造が比較的簡単であることから、その製造工程は簡便で工程が少ない。そのため、通常の工程数増加に伴う、製剤含

有酵素の活性低下を著しく低減することができる。また、簡単なことではあるが、最も重要な工程の管理は、温度管理である。すなわち、硬化油の溶融後に粉体である酵素を混合して酵素混合硬化油を調製し、該混合物を維持するときの温度、また酵素混合硬化油を担体である糖類に付着あるいは皮膜を形成するときの糖類の温度、糖類に付着あるいは皮膜を形成した後の酵素組成物の温度、さらには最終産物の粒状酵素組成物を得るときに冷却する際の温度を規定することで、目的の湿熱に安定で、均質な構造物を製造することができる。

#### 【0018】

具体的には、本発明の製造法では、まず硬化油を溶融し、これに酵素を加えて混合し、酵素混合硬化油を得る。一方、糖類を硬化油の融点付近の温度に保温しておき、前記の酵素混合硬化油を徐々に添加した後、35℃程度まで冷却することによって、糖類の外周表面に酵素混合硬化油を付着もしくは皮膜を形成させる。最後に、不要な大粒子をふるい分け等で除去し、目的の粒状酵素組成物を得ることができる。

#### 【0019】

本発明の粒状酵素組成物は、前記した酵素組成物としての形態を有するものである限り、その製造法は限定されないし、この製造法に用いる機械や施設などについても特に限定されるものではなく、製造法に適したものを適宜選択して使用すれば良い。

#### 【0020】

次に、請求項15および16記載の本発明は、ペレット状飼料としての用途に関するものである。

ペレット状飼料の製造は、基本的には常法により行えばよく、製造過程において、標準飼料に本発明の粒状酵素組成物を混合し、湿熱条件下で滅菌および加工を行う。本発明の粒状酵素組成物は、前記したように、湿熱安定性を有しているため、湿熱加工やスチーム滅菌されるペレット状飼料の製造に使用しても、酵素は安定に存在し、当該飼料を給餌された家畜に対して、酵素が持つ本来の能力が発揮される。

#### 【0021】

**【実施例】**

本発明による粒状酵素組成物の実施例、試験例を以下に例示するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

なお、実施例などで使用した酵素は、トリコデルマ・ビリデ由来のセルラーゼ原末（明治製菓社製）であり、硬化油は、新日本理化社製のパーム硬化油（極度A）を、グラニュー糖は、日新製糖社製の「グラニュー糖G（粒径0.25～1mm）」を、また乳糖は、DMVインターナショナル社製の乳糖#100を用いた。

**【0022】****実施例1 粒状酵素組成物Aの調製**

パーム硬化油20gを100mL容のガラス製ビーカーに入れて、80℃±1℃の恒温水槽中に浸漬し、スパーテルを用いて攪拌、溶融した。次に、トリコデルマ・ビリデのセルラーゼ原末6gを攪拌しながら混合して、酵素混合硬化油を調製した。

一方、グラニュー糖174gを500mL容のプラスチック製ビーカーに入れ、50℃±1℃の恒温水槽中で保温した後、上記の酵素混合硬化油26gを徐々に添加した。その後、35℃まで冷却して硬化油を固化させたのち、目の開きが1.4mmのふるいで不要な大粒子を除去して、目的とするトリコデルマ・ビリデのセルラーゼ含有量が3重量%の粒状酵素組成物Aを得た。

**【0023】****実施例2 粒状酵素組成物Bの調製**

パーム硬化油20gを100mL容のガラス製ビーカーに入れて、80℃±1℃の恒温水槽中に浸漬し、スパーテルを用いて攪拌、溶融した。次に、トリコデルマ・ビリデのセルラーゼ原末6gを攪拌しながら混合して、酵素混合硬化油を調製した。

一方、乳糖174gを500mL容のプラスチック製ビーカーに入れ、50℃±1℃の恒温水槽中で保温した後、酵素混合硬化油26gを徐々に添加した。しかる後、35℃まで冷却して硬化油を固化させたのち、目の開きが1.4mmのふるいで不要な大粒子を除去し、目的とするトリコデルマ・ビリデのセルラーゼ含有量が3重量%の粒状酵素組成物Bを得た。

## 【0024】

## 実施例3 粒状酵素組成物Cの調製

グラニュー糖 130.5kg をベルトフィダー（光洋機械産業社製）で振動流動層乾燥機（VDF-6000、不二パウダル社製）を用いて品温を 55℃ に加温調整した後に、電熱ヒーターで保温したマゼラー混合機（PM-200VP、マゼラー社製）に全量を投入し混合した。

一方で、硬化油融解槽（T.K.ユニミキサー、特殊機化工業社製）にパーム硬化油 15kg の全量を投入し、液温を 80℃ ± 3℃ に調整しながら溶融した後、トリコデルマ・ビリデのセルラーゼ原末 4.5kg を投入し、混合して酵素混合硬化油を調製した。

その後、マゼラー混合機内のグラニュー糖の品温が 55℃ ± 1℃ で安定化したところで、グラニュー糖を混合しながら前記酵素混合硬化油を保温した注入ノズルに送液し、全量（19.5kg）を約 15 分間かけて流し入れた。しかる後、均一に分散させるため約 10 分間混合した。このときの品温は、約 60℃ となった。

## 【0025】

次に、スポットエアコン（日立空調システム社製）を用いて冷風を送風して混合しながら、品温を 56℃ ± 1℃ まで冷却した。その後、マゼラー混合機から混合物を速やかにコンクリートミキサー（PT-200、マゼラー社製）に移し、混合しながら、スポットエアコンを用いて品温が 35℃ 以下になるまで冷却した。

次に、円形ふるい（カートリッジタイプ、ダルトン社製）で篩過して不要な大粒子を除去し、目的とするトリコデルマ・ビリデのセルラーゼ含有量が 3 重量% の粒状酵素組成物 C を得た。

## 【0026】

## 実施例4 粒状酵素組成物Dの調製

グラニュー糖 123kg を、ベルトフィダーを用いて品温を 57℃ に調整した後に、これを電熱ヒーターで保温したマゼラー混合機に全量を投入し、混合しながら、この工程での品温管理は 55℃ とした。

一方で、硬化油融解槽にパーム硬化油 18kg の全量を投入し、液温を 81℃ ±

2℃に調整しながら溶融した後、トリコデルマ・ビリデのセルラーゼ原末 9 kg を投入し、混合して酵素混合硬化油を調製した。

以上の工程を経た後、マゼラー混合機内のグラニュー糖の品温が  $57^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  で安定化したところで、グラニュー糖を混合しながら、酵素混合硬化油を保温した注入ノズルに送液し、全量 (27 kg) を約 20 分間かけて流し入れた。その後、均一に分散させるため約 10 分間混合した。このときの品温は、約  $58^{\circ}\text{C}$  となった。

#### 【0027】

次に、スポットエアコンを用いて冷風を送風して混合しながら、品温を  $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  まで冷却したのち、マゼラー混合機から酵素含有混合物を速やかにコンクリートミキサーに移し、滞留がないよう注意しながら混合し、スポットエアコンを用いて品温が  $35^{\circ}\text{C}$  以下になるまで冷却した。次いで、ダルトン篩過機を用いて不要な大粒子を除去し、目的とするトリコデルマ・ビリデのセルラーゼ含有量が 6 重量%の粒状酵素組成物 D を得た。

#### 【0028】

##### 実施例 5 ペレット状飼料の調製

子豚用標準飼料 (日本配合飼料社製) 100 kg に対して実施例 3 の粒状酵素組成物 C の 70 g を均一に混合した後、ペレット飼料製造機 (カリフォルニア・ペレット・ミル社製 1100 シリーズ) を用いて、水蒸気温度  $74 \sim 86^{\circ}\text{C}$  の条件で製造した。ペレット飼料製造機内を通過し製造されたペレットは、すぐに冷風にて冷却した。得られたペレット状飼料の形状は、直径 3.0 ~ 4.0 mm、長さ 5 mm 前後であった。

#### 【0029】

##### 比較例 1 粉末状酵素組成物 a の調製

ダルトンリボンプレンダーを用いて、米ぬか油かす 5.0 kg、トリコデルマ・ビリデのセルラーゼ原末 300 g、米ぬか油かす 4.7 kg の順に投入し、30 rpm で 10 分間回転させて、目的とするトリコデルマ・ビリデのセルラーゼが 3 重量%の粉末状酵素組成物 a を得た。

#### 【0030】

**【試験例】****試験例 1 各種酵素組成物の湿熱安定性の評価****[分析方法]****1. セルラーゼ活性の測定及び単位の定義:**

セルラーゼを酢酸緩衝液 (pH 4.5) で抽出して試料溶液とし、青色色素をカップリングさせたCM-CELLULOSE (Megazyme社製) と反応させた。この着色されたCM-CELLULOSEは粉末状態で使用でき、40℃、pH 4.5の条件下で10分間酵素処理を行った後、酸性アルコールで反応停止させた。

その後、反応液を遠心分離して得られた上清中の青色色素の量を吸光度測定 (620nm) し、ブランク液から得られる吸光度を除いた値を求めた。同時に酵素反応させたセルラーゼ標準溶液の検量線を基にして、セルラーゼ活性 (単位: u/mL) を求めた。

**【0031】****2. 測定の範囲:**

試料溶液を希釈することにより、繊維糖化活性が、0.05~0.3 u/mLとなるように調製した。この繊維糖化活性の測定の範囲は、酵素組成物に含まれる酵素として、10~10000 u/gに相当する。

**3. 試料溶液の調製方法:**

約1gのセルラーゼ試料を100mL容の三角フラスコにとり、50mLの酢酸緩衝液 (pH 4.5) を加えて栓をして、マグネチックスターラーで60分間、室温で攪拌し、0.45 μmのメンブランフィルター (Maillex-HV、口径25mm、MILLIPORE社製) でろ過し、試料溶液とした。

**【0032】****4. セルラーゼ標準溶液:**

繊維糖化力が既知であるトリコデルマ・ビリデのセルラーゼより、0.05~0.3 u/mLの範囲で活性が正確に表示できる標準溶液を、酢酸緩衝液 (pH 4.5) を用いて調製した。

**5. 湿熱安定性の評価:**

動物用飼料製造 (家禽および魚類) のために採用されているペレット化工程の

中で行われる湿熱処理の工程を、下記のように実験室内で再現させ、各種酵素組成物の湿熱安定性を評価した。すなわち、試料の約 0.5g をガラス容器に取り、予め含水させた米ぬか油かすを 1g 加えて混合した後、100℃の乾熱機（暖気循環型）の棚上に置いて 8 分間湿熱処理を行った後、それぞれの酵素組成物の湿熱安定性についてセルラーゼ活性の残存率を求めた。その結果を第 1 表に示した。

【0033】

【表 1】

第 1 表

	試料名	セルラーゼ活性 残存率 (%)
実施例 1	粒状酵素組成物 A	93
実施例 2	粒状酵素組成物 B	55
実施例 3	粒状酵素組成物 C	89
実施例 4	粒状酵素組成物 D	84
比較例 1	粉末状酵素組成物 a	12

【0034】

第 1 表の結果は、本発明の粒状酵素組成物 A～D は、比較対照の粉末状酵素組成物 a に比べて、湿熱処理後のセルラーゼ残存活性率が非常に高いことを示している。

【0035】

試験例 2 市販品と本発明に係る粒状酵素組成物の湿熱安定性の比較

市販セルラーゼ（ロシュ社製、商品名：RONOZYME VP、ロット番号 K T 9 0 2 0 1 5）と本発明に係る粒状酵素組成物の湿熱安定性を、試験例 1 に記載の分析方法を用いて比較した。その結果を第 2 表に示した。

【0036】

【表 2】

第 2 表

	試料名	セルラーゼ残存率 (%)
実施例 3	粒状酵素組成物 C	76
市販セルラーゼ	RONOZYME	7

## 【0037】

第2表の結果は、本発明の粒状酵素組成物は、比較対照とした市販品より有意に湿熱安定性であることを示している。

## 【0038】

試験例3 ペレット状飼料における本発明の粒状酵素組成物の湿熱安定性

子豚用標準飼料（日本配合飼料社製）100kgに実施例3で調製した粒状酵素組成物Cを1.4重量%またはその2倍量の2.8重量%を添加して、ペレット飼料製造機（カリフォルニア・ペレット・ミル社製1100シリーズ）を用いて、水蒸気温度74～86℃の条件でペレット状飼料を製造した。

ペレット状飼料の品温が78～80℃になったことを確認し、飼料を採取した。飼料の採取後、湿熱履歴を考慮し、速やかにスポットエアコンの冷風にて冷却して、分析用試料とした。

市販セルラーゼ（ロシュ社製、商品名：RONOZYME VP、ロット番号KT902015）を用いたこと以外は同様にしてペレット状飼料を製造し、試験例1に記載の方法で湿熱安定性を、セルラーゼ活性の残存率で比較した。その結果を第3表に示した。

## 【0039】

## 【表3】

第3表

試料名	セルラーゼ活性 残存率 (%)
粒状酵素組成物Cを1.4重量%含有するペレット状飼料	12
粒状酵素組成物Cを2.8重量%含有するペレット状飼料	23
市販セルラーゼを1.4重量%含有するペレット状飼料	2
市販セルラーゼを2.8重量%含有するペレット状飼料	11

## 【0040】

第3表の結果は、本発明の粒状酵素組成物は、ペレット状飼料の製造において、市販品より有意に安定であることを示している。

## 【0041】

## 【発明の効果】

本発明の粒状酵素組成物は、高温高湿条件下での安定性に優れている。そのため、セルラーゼなどの酵素を含有するペレット状飼料の製造等に好適に使用することができる。

また、本発明の製造法によれば、前記の粒状酵素組成物を、簡便な工程で、効率よく製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高温高湿条件において安定な粒状酵素組成物および当該粒状酵素組成物の簡便で、効率的な製造法を提供すること。

【解決手段】 核および核を被覆する層からなる酵素組成物であって、核が糖類で、核を被覆する層が酵素および硬化油であることを特徴とする粒状酵素組成物並びに溶解した硬化油と酵素の混合物を、粒状の糖類に付着あるいは皮膜を形成させることを特徴とする上記粒状酵素組成物の製造法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-338864
受付番号	50201764811
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年11月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年11月22日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-338864

出願人履歴情報

識別番号

[000006091]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1990年 8月 3日

新規登録

住 所  
氏 名

東京都中央区京橋2丁目4番16号  
明治製菓株式会社

特願 2 0 0 2 - 3 3 8 8 6 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 0 4 8 1 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区岩本町1丁目10番5号

氏 名

クニミネ工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**